

Reporte preliminar de algunas propiedades de extractos y secreciones de moluscos gasterópodos colectados en las costas de Cuba.

Preliminary report of some properties of secretions and extracts of gastropods from Cuban waters.

Ileana García-Alonso*, José Ramón Martínez*, Angel Valdés**, Katia Acosta*, Circe Mesa*, Maritza Pérez*, Abel Aneiros* y Jesús Ortea**.

* Centro de Bioactivos Marinos, Instituto de Oceanología, Academia de Ciencias de Cuba. Loma y 37, Alturas del Vedado, Código Postal 10600, Ciudad de la Habana, Cuba.

** Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Laboratorio de Zoología, Universidad de Oviedo. Jesús Arias de Velasco s/n, 33005 Oviedo, Asturias, España.

Resumen

Se evaluaron la toxicidad y características químicas de las secreciones y/o extractos de tejidos de 5 especies de gasterópodos abundantes en las costas cubanas: *Aplysia dactylomela*, *Aplysia juliana*, *Bursatella leachi*, *Petalifera ramosa* y *Onchidella floridiana*. Los resultados obtenidos aportan nueva información sobre la actividad biológica de las sustancias químicas de estas especies. Sólo algunas muestras de las especies del género *Aplysia* fueron tóxicas en cangrejos y peces. En al menos uno de los extractos de cada especie estudiada se detectó actividad anticolinesterásica.

Abstract

The toxic and chemical characteristics of fluid and tissue extracts of 5 species of gastropods were evaluated: *Aplysia dactylomela*, *Aplysia juliana*, *Bursatella leachi*, *Petalifera ramosa*, *Onchidella floridiana*. The reported results provide new information concerning the biological activity of the chemical products of these species. Only some samples from *Aplysia* species were toxic to crabs and fishes. Anticholinesterasic activity were detected in at least one of the samples from all the studied species.

Palabras clave: extractos bioactivos marinos, tinta, actividad anticolinesterásica, toxicidad, gasterópodos marinos.

Key words: bioactive marine extracts, fluid, anticholinesterasic activity, toxicity, marine gastropods.

INTRODUCCIÓN

Muchos de los compuestos descubiertos en plantas y animales marinos son biológicamente activos y presentan gran importancia debido a sus propiedades antivirales, antibacterianas, antitumorales, anti-inflamatorias, cardiovasculares y neuroactivas, entre otras (HALSTEAD, 1978; RINEHART, HOLT, FREGEAN, KEIFER, WILSON, PERUN, SAKAI, THOMPSON, STROH, SHIELD Y SEIGLER, 1990; SCHMITZ Y YASUMOTO, 1991).

Se ha demostrado que los extractos y secreciones de varias especies de moluscos, en particular de la clase gasterópodos, contienen sustancias lipofílicas de bajo peso molecular con acciones citolíticas, antineoplásicas y antibacterianas (FUSETANI, WOLSTENHOLME Y MATSUNAGA, 1991; FAULKNER, 1990; CIMINO, DE STEFANO, DE ROSA, MORRONE Y SODANO, 1985; NORTE, CATALDO, GONZÁLEZ, RODRÍGUEZ Y RUIZ-PÉREZ, 1990). Estos compuestos son adquiridos por los animales fundamentalmente a través de la dieta y provienen del metabolismo secundario de sus presas (generalmente algas y esponjas), pero en algunos casos son modificados e incluso sintetizados por el propio molusco (CIMINO, DE ROSA, DE STEFANO, SODANO Y VILLANI, 1985). Más recientemente se han encontrado también compuestos bioactivos de alto peso molecular en algunos opisthobranchios (KAMIYA, MURAMOTO, GOTO, YAMAZAKI, 1988; KISUGI, KAMIYA Y YAMAZAKI, 1987). No obstante la presencia de sustancias hidrofílicas en estos animales ha sido muy poco estudiada.

En el presente se ha incrementado el interés por el estudio de bioactivos en los moluscos gasterópodos que habitan en las costas de Cuba, constituyendo el objetivo del presente trabajo la obtención y caracterización preliminar de las fases hidrosolubles de extractos y/o secreciones de 5 especies, 4 de ellas opisthobranchios, relativamente abundantes en la plataforma cubana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta

El material de *A. dactylomela*, *A. juliana*, *B. leachi* y *P. ramosa* procede de distintos puntos de la Ciudad de la Habana, costa Norte de Cuba, mientras que el material de *O. floridiana* se colectó en Jucaral, Bahía de Cienfuegos, Sur de Cuba. Todos los animales fueron capturados entre los meses de mayo y junio de 1993, excepto los ejemplares de *A. dactylomela* que se colectaron y procesaron en enero de 1991.

El material de *Petalifera* y *Onchidella* se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

Los especímenes de *Aplysia* y *Bursatella* se trasladaron vivos al laboratorio donde se colectó el mucus que los mismos secretan espontáneamente y posteriormente se les extrajo la tinta de la cavidad del manto previo estrés mecánico. Estos materiales se congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Finalmente se disecaron los mantos de *A. juliana* y *B. leachi* y el pie de *A. dactylomela* que también se congelaron a -20°C .

Preparación de extractos

Después de separar la fracción etérea, se le realizaron los diferentes ensayos propuestos a la fase acuosa.

De manera análoga se procesó el músculo del pie de *A. dactylomela* (PAD), aunque en este caso la extracción se hizo con agua destilada y no se delipidó el material.

Tinta: Se descongeló la tinta colectada a partir de *A. juliana* y *B. leachi* (TAj y TBl) y después de centrifugar se liofilizó el sobrenadante. Se pesaron 200 mg del liofilizado y se le adicionaron 4 ml de agua destilada, se agitó durante 30 min y se centrifugó a 3000

rpm. El sobrenadante se delipidó con éter de petróleo y a la fase hidrosoluble se le realizaron los diferentes ensayos propuestos.

Mucus: Se descongeló la secreción colectada a partir de la *A. juliana* (MAj) y después de centrifugar se liofilizó el sobrenadante. Se pesaron 200 mg del liofilizado y se le adicionaron 4 ml de agua destilada, se agitó durante 30 min y se centrifugó a 3000 rpm. Al sobrenadante se le realizaron los diferentes ensayos propuestos.

Con *O. floridiana* se preparó un extracto total utilizando una mezcla metanol: acetona (1:1) y una relación S:L (1:4). Se homogeneizó durante 1-2 min en un homogeneizador y se centrifugó 10 min a 6500 rpm. El sobrenadante se evaporó al vacío a 40°C y se le extrajo la fase lipofílica con éter de petróleo. Después de separar la fracción etérea se liofilizó la fase acuosa. 200 mg del material liofilizado se disolvieron en 4 ml de agua destilada, agitándose durante 30 min y centrifugándose 20 min a 3000 rpm. Al sobrenadante se le realizaron los diferentes ensayos propuestos.

Evaluación de toxicidad

Ensayos de toxicidad en cangrejos: Se utilizaron cangrejos machos de la especie *Uca thayeri*, de 1-2 g de peso, inyectando en el hemocele 0.01 ml de muestra por g de animal (dosis de 0.5 mg/g, n=3). Las muestras fueron evaluadas como tóxicas (T) si provocaban parálisis y/o imposibilidad de volteo a los 10 min de administradas (GALETTIS Y NORTON, 1990).

Ensayos de toxicidad en peces: Se utilizaron peces machos adultos de la especie *Poecilia reticulata*, de 85-95 mg de peso. Se adicionaron 0.5 ml de muestra a un volumen de 20 ml de agua (dosis de 1 mg/ml, n=3) y se siguió el test de Mebs modificado (GARCÍA-ALONSO, MARTÍNEZ, ANEIROS, ACOSTA, LLANIO, DÍAZ, CONCEPCIÓN, COWLEY, MORALES, PÉREZ, GONZÁLEZ Y LLORENTE, 1993). Los animales fueron observados durante 24 h y los efectos provocados por las muestras se evaluaron como tóxicos (T) si alteraban el patrón de conducta de los peces en los primeros 30 min después de administradas.

Determinaciones analíticas

Se determinó la concentración de carbohidratos por el método del fenol-sulfúrico (DUBOIS, GILLS, HAMILTON, REBERT Y SMITH, 1956) y la de proteínas según el método de LOWRY (1951). La cromatografía en placa fina se desarrolló empleando sílica-gel como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de cloroformo: metanol: agua (7:5:0.9) y 1-butanol: ácido acético: agua (12:3:5). Las placas se revelaron en una cámara saturada con yodo. Los espectros UV-Visible se registraron en agua destilada, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

La actividad anticolinesterásica se determinó por el método de ELLMAN, COURTNEY, ANDRES Y FEATHERSTONE (1961), utilizando acetiltiocolina como sustrato y como fuente enzimática la colinesterasa de suero equino. Para conocer la capacidad de inhibición de colinesterasa, se incubaron 200 µl de las muestras en estudio (9 mg/ml) con 50 µl de la enzima durante 10 min a 25°C. Los resultados se obtuvieron como unidades de absorbancia por minuto y se reportan como porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

RESULTADOS

Se estudiaron los extractos y/o secreciones de 4 especies de Opisthobranchios del orden Anaspidea y de una especie marina de la subclase de los Pulmonados.

Los resultados de la caracterización se muestran en la tabla 1. Un análisis comparativo entre los resultados de la caracterización química de las muestras de las diferentes especies evidencia que por lo general el pH es neutro, excepto para el MAj (ligeramente básico) y el MaPr (ligeramente ácido).

La concentración de proteína en TAj es relativamente más elevada que en los extractos y secreciones de las otras especies y el contenido de carbohidratos en Of es prácticamente el doble de lo encontrado para el resto de las muestras.

La actividad anticolinesterásica fue significativa en las secreciones TAj y TBI y en los extractos MaPr, PAd y Of.

En los espectros de los extractos de todas las especies se observaron 2 máximos cerca de los 250 y 320 nm, este último con menor intensidad, lo cual es indicativo de la presencia de compuestos con insaturaciones conjugadas. No obstante se encontraron diferencias en la posición específica de estos máximos, fundamentalmente en el segundo. El PAd posee bajas actividades hemolítica, fosfolipásica y tiene acción.

Por otra parte la tinta y el extracto del manto de *A. juliana*, resultaron tóxicos en cangrejos y peces. A los 10 min de inyectados los cangrejos con MAj se observó una ligera parálisis y aunque a los 15 min los animales no podían voltearse, se recuperaron a las 24 h. En los peces este extracto provocó saltos e intranquilidad extrema durante la primera hora pero a partir de las 2 h se observó inmovilidad tónica.

Los cangrejos inyectados con TAj mostraron parálisis rígida a los 5 min, notable cambio de color y pérdida de la capacidad de volteo a partir de los 10 min. A las 24 h el 50% de los animales había muerto. En los peces también se apreció a los 10 min el cambio de color acompañado de inmovilidad tónica y disminución de los movimientos pectorales y branquiales. A las 2 h se observó gran intranquilidad.

El extracto PAd provocó parálisis y engarrotamiento en cangrejos a los 15 min de inyectados pero no resultó tóxico en peces.

DISCUSIÓN

De la clase Gasterópodos (Phylum Moluscos) se han aislado varios compuestos biológicamente activos que se piensa juegan un importante papel en el mecanismo de defensa de estos animales contra sus depredadores potenciales. La mayoría de estas sustancias son lipofílicas y de bajo peso molecular, derivadas de las algas y esponjas que le sirven de dieta, aunque en algunos casos pueden ser biosintetizadas por el propio animal.

Dentro de los opisthobranchios, las especies pertenecientes al orden Anaspidea tienen bien desarrollado su mecanismo de defensa química. De *B. leachi* se obtuvo la bursatellina y de diferentes especies de *Aplysia* se han aislado compuestos como el dictyol y la aplykurodinona con fuerte actividad ictiotóxica y deterrente (CIMINO *ET AL.*, 1985), lectinas

aglutinantes de bacterias marinas (KAMIYA Y SHIMIZU, 1981), y glicoproteínas con propiedades citolíticas antitumorales y antineoplásicas (KAMIYA ET AL., 1988; KISUGI ET AL., 1987). También se han encontrado toxinas y antibióticos en estos animales (KAMIYA ET AL., 1989).

Aunque la mayoría de estos compuestos se han obtenido de hepatopáncreas, glándula femenina, huevos y tinta, se conoce que las sustancias utilizadas por el animal para su defensa se almacenan en el tejido del manto, por lo que decidimos iniciar la búsqueda de los compuestos bioactivos en las secreciones y los extractos de este tejido.

Como parte de los estudios recientemente comenzados sobre las sustancias bioactivas de los moluscos gasterópodos de las costas de Cuba se acometió la obtención y caracterización preliminar de las fases hidrosolubles de extractos y/o secreciones de *A. juliana*, *A. dactylomela*, *B. leachi*, *P. ramosa* y *O. floridiana*.

Las determinaciones analíticas realizadas evidenciaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre los extractos y secreciones de las distintas especies así como entre las diferentes preparaciones de una misma especie.

En general la concentración de proteína en las muestras fue relativamente baja y variable. Por su parte el contenido de carbohidratos libres determinado en los extractos del manto fue mayor que en las secreciones. No obstante en estas últimas la concentración de polisacáridos pudiera ser alta en correspondencia con lo reportado en la literatura para las secreciones de los anaspídeos (CIMINO ET AL., 1985; KAMIYA ET AL., 1988). La baja concentración de proteína y carbohidratos en MAj, unido a un alto porcentaje de cenizas (68%), es característico de las secreciones mucosas de otros invertebrados (cnidarios y esponjas) (GARCÍA-ALONSO Y ANEIROS, 1992).

Los resultados de la cromatografía en placa fina pusieron de manifiesto la mayor complejidad de los extractos de tejidos respecto a las secreciones, encontrándose además diferencias cualitativas entre todas las muestras, particularmente interesantes entre las tintas de *A. juliana* y *B. leachi*.

En correspondencia con lo anterior los espectros de ambas secreciones también fueron diferentes, notándose que en TBI no se observan máximos por debajo de 300 nm mientras que en TAJ sólo aparece un máximo de absorbancia a 262 nm. Consecuentemente con el color púrpura de TBI, en el espectro de esta muestra aparecen máximos solapados a 495 y 548 nm. Los responsables del color en la tinta de los animales de este orden han sido relativamente poco estudiados, aunque se reporta que en la tinta de *Aplysia kurodai* esta coloración está asociada a la presencia de diterpenos brominados (YAMAMURA Y TAKEDA, 1977).

Sólo la tinta y el extracto del manto de *A. juliana* resultaron tóxicos en cangrejos y peces, mientras que el extracto del pie de *A. dactylomela* resultó también tóxico en cangrejos. La toxicidad en cangrejos de la tinta de *A. juliana* fue reportada por KAMIYA ET AL. (1989) sólo en la fase de la secreción soluble en n-hexano. En general se reporta que los compuestos lipofílicos son los causantes de la letalidad que provocan las secreciones de moluscos en animales de sangre fría. El extracto acuoso de *A. dactylomela* administrado en ratones por vía ip (dosis 250 mg/Kg) es letal en menos de 24 h y provoca un cuadro típico depresivo del sistema nervioso central (GARCÍA-ALONSO ET AL., 1992).

Tabla 1. Características de los extractos y secreciones de los gasterópodos analizados.
Table 1. Characteristics of the secretions and extracts from gastropods.

Muestra	Toxicidad Cangrejos	Toxicidad Peces	pH	Espectro UV (max; nm)	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)	Act. Anti-ChE (% inhibición)	Cromatografía en capa Rf
MAj	NT	NT	7.9	270	0.6	0.2	9	0.18; 0.34; 0.65
TAj	T	T	6.9	262	11.4	4.6	58	0.12; 0.29; 0.39; 0.72
MaAj	T	T	7.1	251; 294	2.0	7.4	11	0.21; 0.33; 0.66; 0.80
PAd	T	NT	7.5	326	30.0	3.9	40	-
TBI	NT	NT	6.6	328; 495; 548	5.6	1.6	61	0.12; 0.22; 0.46; 0.65
MaBI	NT	NT	7.0	250; 336	8.7	5.9	17	0.14; 0.28; 0.36; 0.42; 0.64; 0.77
MaPr	-	NT	6.2	262; 327	6.3	3.0	58	0.14; 0.35; 0.44; 0.65
Of	NT	NT	7.0	249; 329	6.1	12.8	41	0.13; 0.36; 0.46; 0.50; 0.68; 0.84

* Cloroformo: metanol: agua

** Butanol: acético: agua

MAj: mucus de *Aphysia juliana*.

TAj: tinta de *Aphysia juliana*.

MaAj: extracto del manto de *Aphysia juliana*.

PAd: extracto del pie de *Aphysia dactylomela*.

TBI: tinta de *Bursatella leachi*.

MaBI: extracto del manto de *Bursatella leachi*.

MaPr: extracto del manto de *Petalifera ramosa*.

Of: extracto de *Onchidella floridiana*.

Finalmente no se observó una relación directa entre la actividad anticolinesterásica y la toxicidad en peces y cangrejos, excepto para los casos de TAJ y PAD a pesar de que las manifestaciones conductuales y los cambios en la coloración de estos animales pudieran ser indicativos de una posible acción colinérgica de las muestras. Debe señalarse que la actividad anticolinesterásica fue significativa en Of, PAD, MaPr, TAJ y TBI, lo que constituye el primer reporte de este tipo de acción para compuestos hidrofílicos en estos animales. Con anterioridad sólo se conocía la presencia de un inhibidor de colinesterasa en *Onchidella*, asociado a un compuesto de naturaleza lipofílica, el onchidal (AMBRAMSON, RADIC, MANKER, FAULKNER Y TAYLOR, 1989).

Resulta además singularmente interesante el haber detectado la actividad en las secreciones de *Bursatella* y *Aplysia* pero no en los correspondientes extractos del manto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto Superior Técnico de Cienfuegos el apoyo que nos ha brindado para la captura del material de *O. floridiana* estudiado en este trabajo. También agradecemos al Dr. José Espinosa y a Francisco Fernández Garcés su participación en la recolección del material.

BIBLIOGRAFIA

- AMBRAMSON, S., RADIC, Z., MANKER, D., FAULKNER, J. Y TAYLOR, P. 1989. Onchidal: A naturally occurring irreversible inhibitor of acetylcholinesterase with a novel mechanism of action. *Molecular Pharmacology*, 36: 349-354.
- CIMINO, G., DE STEFANO, S., DE ROSA, S., MORRONE, R. Y SODANO, G. 1985. The chemical defense of nudibranch molluscs. *Tetrahedron*, 41 (6): 1093-1100.
- CIMINO, G., DE ROSA, S., DE STEFANO, S., SODANO, G. Y VILLANI, G. 1985. Dorid nudibranchs elaborates its own chemical defense. *Science*, 219: 1237-1238.
- DUBOIS, M., GILLS, K. A., HAMILTON, J. K., REBERT, P. A. Y SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. Y FEATHERSTONE, R. M. 1961. Colorimetric method for cholinesterase determination. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.
- FAULKNER, D. J. 1990. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Reports*, 269-309.
- FUSETANI, N., WOLSTENHOLME, H. J. Y MATSUNAGA, S. 1991. Two new sesquiterpene isonitriles from the nudibranch *Phyllidia pustulosa*. *Tetrahedron Lett.*, 32 (49): 7291-7294.
- GALETTIS, P. Y NORTON, R. S. 1990. Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of tenebrosin C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon*, 28 (6): 695-706.
- GARCÍA-ALONSO, I. Y ANEIRO, A. 1992. *Comparative Study of Bioactive Properties of Cuban Sea-shore Marine Species*. VII International Symposium on Marine Natural Products, Italy.
- GARCÍA-ALONSO, I., MARTÍNEZ, J. R., ANEIRO, A., ACOSTA, K., LLANIO, M., DÍAZ, M., CONCEPCIÓN, A.R., COWLEY, S., MORALES, A.R., PÉREZ, M., GONZÁLEZ, O., LLORENTE, S. 1993. Biological activity of secretions and extracts of gorgonians from cuban waters. *J. Nat. Toxin*, 2 (1): 27-40.
- HALSTEAD, B.W. 1978. *Procurement of crude marine pharmaceutical products*. International Biotoxicological Center, World Life Research Institute, California, 11 pp.
- KAMIYA, H. Y SHIMIZU, Y. 1981. A natural agglutinin inhibitable by D-galacturonic acid in the sea hare *Aplysia* eggs: characterization and purification. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 47: 255-259.
- KAMIYA, H., MURAMOTO, K., GOTO, R. Y YAMAZAKI, M. 1988. Characterization of the antibacterial and anti-neoplastic glycoproteins sea hare *Aplysia juliana*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (5): 773-777.
- KAMIYA, H., MURAMOTO, K., GOTO, R., SAKI, M., ENDO, Y. Y YAMASAKI, M. 1989. Purification and characterization of an antibacterial and antineoplastic protein secretion of a sea hare *Aplysia juliana*. *Toxicon*, 27 (12): 1269-1277.

- KISUGI, J., KAMIYA, H. Y YAMAZAKI, M. 1987. Purification and characterization of aplysinin E, an antitumor factor from sea hare eggs. *Cancer Research*, 47: 5649-5653
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. Y RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275
- NORTE, M., CATALDO, F., GONZÁLEZ, A. G., RODRÍGUEZ, M. L., RUIZ-PÉREZ, C. 1990. New metabolites from the marine mollusc *Siphonaria grisea*. *Tetrahedron*, 46 (5): 1669-1678.
- RINEHART, K., HOLT, T. G., FREGEAN, N. L., KEIFER, P. A., WILSON, G. R., PERUN, T. J., SAKAI, R., THOMPSON, A. G., STROH, J. G., SHIELD, L. S., SEIGLER, D. S. 1990. *J. Nat. Prod.*, 53 (4): 771-792.
- SCHMITZ, F. J. Y YASUMOTO, T. 1991. The 1990 US-Japan seminar on bio-organic marine chemistry. Meeting and report. *J. Nat. Prod.*, 54 (6): 1469-1490.
- YAMAMURA, S. Y TAKEDA, Y. 1977. Isoaplysin-20, a natural bromine-containing diterpene, from *Aplysia kurodai*. *Tetrahedron Lett.*, 18: 2171-2172.